

Patent Abstracts of Japan

PUBLICATION NUMBER : 08131185  
PUBLICATION DATE : 28-05-96

APPLICATION DATE : 14-11-94  
APPLICATION NUMBER : 06278825

APPLICANT : SUMITOMO ELECTRIC IND LTD;

INVENTOR : MIYABE YUKI;

INT.CL. : C12P 21/08 C07K 16/28 C12N 5/10 C12N 15/02 G01N 33/53 G01N 33/577 // A61K 39/395 (C12P 21/08 , C12R 1:91 )

TITLE : MONOCLONAL ANTIBODY AGAINST MURINE VLA-1 MOLECULE

ABSTRACT : PURPOSE: To obtain the subject antibody useful for elucidating mechanisms of migration, differentiation and proliferation of cells in development of animal embryos and further curing of wounds, canceratd cell metastasis, etc.; functional analysis of an extracellular matrix(ECM) in chronic articular rheumatism diseases, immunotherapy, diagnosis, etc.

CONSTITUTION: A monoclonal antibody capable of specifically reacting with a very late activation antigen(VLA)-1 molecule which is a murine cell surface molecule or its active fragment. A rodent is immunized and sensitized with a murine neuroblastoma cell strain (C1300) as an antigen regarded as expressing the VLA-1 and a cell of the spleen of the rodent is fused to a cell of a myeloma to provide hybridomas. A hybridoma capable of producing the monoclonal antibody against the VLA-1 is selected therefrom and cultured under suitable conditions to produce the monoclonal antibody.

COPYRIGHT: (C)1996,JPO

(19) 日本国特許庁 (JP)

## (12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-131185

(43) 公開日 平成8年(1996)5月28日

(51) Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	FI	技術表示箇所
C 1 2 P 21/08		9358-4B		
C 0 7 K 16/28		8318-4H		
C 1 2 N 5/10				
		7729-4B	C 1 2 N 5/ 00	B
		9281-4B	15/ 00	C
審査請求 未請求 請求項の数6 OL (全 7 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号	特願平6-278825	(71) 出願人	000002130 住友電気工業株式会社 大阪府大阪市中央区北浜四丁目5番33号
(22) 出願日	平成6年(1994)11月14日	(72) 発明者	三宅 幸子 東京都文京区本郷2-1-1 順天堂大学 医学部内
		(72) 発明者	桜井 智子 東京都文京区本郷2-1-1 順天堂大学 医学部内
		(72) 発明者	八木田 秀雄 東京都文京区本郷2-1-1 順天堂大学 医学部内
		(74) 代理人	弁理士 青山 葆 (外1名) 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 マウスVLA-1分子に対するモノクローナル抗体

## (57) 【要約】

【構成】 マウスの細胞表面分子であるVLA-1分子に特異的に反応するモノクローナル抗体およびその活性フラグメント、該モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマおよび該モノクローナル抗体の製造方法が提供される。

【効果】 本発明のVLA-1分子に対するモノクローナル抗体およびその活性フラグメントは、VLA-1発現細胞とそのリガンドとの相互作用の解析を行う際に有用であり、また、免疫治療や診断用としても有用である。

(2)

特開平8-131185

1

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 マウスの細胞表面分子であるVLA-1分子に特異的に反応するモノクローナル抗体。

【請求項2】 IgG型のハムスター抗体である請求項1記載のモノクローナル抗体。

【請求項3】 請求項1記載のモノクローナル抗体のF(ab')<sub>2</sub>、Fab'、Fab、Fv、および組換えFv体から選ばれる活性フラグメント。

【請求項4】 (i) 齧歯類動物をマウスニューロblastoma細胞(C1300)で免疫感作し、

(ii) 該免疫感作した齧歯類動物から脾臓を摘出して脾細胞の懸濁液を調製し、

(iii) 該脾細胞の懸濁液をマウスのミエローマ細胞と融合促進剤の存在下で混合して両細胞を融合し、

(iv) 融合した細胞を未融合ミエローマ細胞を支持しない媒質中で希釈して培養し、

(v) ハイブリドーマを含有する各培養ウエル中の上清液について、マウスニューロblastoma細胞(C1300)との反応性を指標にして抗体の存在を確認し、

(vi) 所望の抗体を産生するハイブリドーマを選択した後、限界希釈法により単一クローンにし、

(vii) その単一クローンのハイブリドーマの培養上清液から抗体を回収する、ことを特徴とする、マウスの細胞表面分子であるVLA-1分子に特異的に反応するモノクローナル抗体の製造方法。

【請求項5】 齧歯類動物がアルメニアンハムスターに属し、ミエローマ細胞がP3U1である請求項5記載の方法。

【請求項6】 マウスの細胞表面に存在するVLA-1分子に特異的に反応するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、マウスの細胞表面分子であるVLA-1分子に特異的に反応するモノクローナル抗体およびその活性フラグメント、該モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ、および該モノクローナル抗体の製造方法、ならびに免疫関連細胞の解析における該モノクローナル抗体およびその活性フラグメントの使用に関するものである。ここで活性フラグメントとは、抗原抗体反応活性を有する抗体フラグメントを指し、具体的にはF(ab')<sub>2</sub>、Fab'、Fab、Fvおよび組換えFv体などである。

【0002】

【従来の技術】 免疫の応答機構は、多種の細胞および調節因子が複雑に相互作用することにより機能している。この機構を解明することにより、免疫関係疾患の発症機構が明らかになり、その治療への応用が可能になるものと期待される。免疫応答の第1段階は、免疫系の細胞が互いに結合することである。次いで、結合によるシ

2

グナル伝達によって互いの細胞が活性化され、種々の調節因子の産生や新たな細胞表面分子の発現が惹起される。この第1段階における細胞間の結合に重要な役割を担うのが、接着分子と称される細胞表面上の機能分子である。また、これら細胞接着分子は、細胞の結合に寄与することにより、細胞の発生、分化および増殖、炎症および創傷の治癒、血液凝固、あるいは癌転移など、生体内の種々の重要な現象に深く関与していることが明らかにされている。これら細胞接着分子についての解説は、10 FASEB Journal, vol. 4, 1990やAnnual Review of Immunology, vol. 8, 1990などの多くの文献に記載されている。

【0003】 細胞接着分子には、細胞間の相互作用に関与するものと、細胞と細胞外マトリックス(ECM)の相互作用に関与するものがある。細胞外マトリックスとは細胞外の空間に存在する巨大分子の複雑な網目構造であり、周囲の細胞から分泌された多糖類とタンパク質で構成される。その構成成分には、フィブロネクチン(FN)、ラミニン(LN)、コラーゲン(CL)、フィブリノーゲン(FB)、ビトロネクチン、テネシシンなどが含まれる。この内、接着には主としてFNと基底膜のLNが関与している。

【0004】 例えば、T細胞とB細胞の主要な免疫応答はT-B細胞結合により行われ、この結合は、T細胞表面のT細胞受容体(TCR)/CD3複合体とB細胞表面の抗原/クラスII MHC複合体の結合を介する。しかし、この複合体を介する結合はT-B細胞間で機能的な相互作用を起こさせる程には十分に強くないため、細胞表面に発現される細胞接着分子が結合の強化あるいは安定化に寄与していることが知られている。このような免疫細胞相互の安定かつ機能的な結合には、細胞-細胞の結合に関与する接着分子だけでなく細胞-ECMの結合に関与する接着分子も関与している。

【0005】 また、癌の転移においては、原発巣から循環系に移行した癌細胞が遠隔臓器に転移する過程において、様々な細胞間および細胞-ECM間の接着分子が関与していることが示唆されている[Annual Review 免疫: VII. 腫瘍免疫, 160-169頁(1992)、中外医学社]。特に、癌細胞による基底層(膜)や間質への侵潤には、癌細胞とECM(FNやLN)との結合が大きな役割を果たしており、細胞表面のECM受容体の機能の解明によって癌転移の機構が明らかになることが期待されている。

【0006】 細胞接着分子は、その類似した構造的特徴から5種類のファミリーに分類されている。その中の1つであるインテグリンファミリーはECMの受容体の1つであり、ECMと細胞内部にある細胞骨格とを連結する膜貫通型の糖タンパク質である。このインテグリンファミリーはαおよびβポリペプチド鎖が非共有結合によって結合したヘテロダイマーであり、β鎖の相違に基づいてさらに3つのサブファミリー(β<sub>1</sub>、β<sub>2</sub>、β<sub>3</sub>)に大

(3)

特開平8-131185

3

別される。即ち、それぞれのサブファミリーの構成員は、異なる $\alpha$ 鎖と共通の $\beta$ 鎖を有している。 $\beta_1$ サブファミリーはVLA(very late activation antigen)とも呼ばれ、互いにホモロジーを有するが異なっている $\alpha$ 鎖( $\alpha_1 \sim \alpha_6$ )と共通の $\beta_1$ 鎖からなる(VLA-1~VLA-6)。一方、 $\beta_2$ サブファミリーには白血球細胞間の接着分子として知られるLFA-1が含まれ、 $\beta_3$ サブファミリーにはVN受容体および血小板表面のgpIIb/IIIa複合体が含まれる。

【0007】VLA-1は $\alpha_1$ 鎖と $\beta_1$ 鎖からなる $\beta_1$ サブファミリーのインテグリンであり、ECMの構成成分であるコラーゲンおよびラミニンの受容体である。VLA-1はラミニンの十字架型構造の核の部分とそのN末端部分を含むE1断片を認識する。ラミニンは神経組織で神経突起の伸長を促すなど成長・分化に重要な役割を果し、VLA-1の神経組織における役割が注目を浴びている。また、VLA-1を発現する神経芽細胞腫細胞を、RGD合成ペプチド存在下で培養し、マトリックスに接着する細胞を選択的に培養し続けると、VLA-1を正常の20倍も発現し、神経突起を持ち、神経細胞の形質を示す株が得られた。即ち、VLA-1の発現増加が形質変化に寄与している可能性がある。

【0008】インテグリンファミリーのインビトロにおける機能解析は、各種モノクローナル抗体の開発の成功により、ヒト細胞を用いて解析が進んできた。一方、インビボにおけるインテグリンファミリーの機能解析を行うためには、マウスやラットなどの実験動物に反応するモノクローナル抗体が必要になる。しかし、このような抗体として、これまでVLA-4およびVLA-5に対する抗体が得られていたにすぎなかった(それぞれ、特願平3-263578および特開平5-244984)。これらの抗体を用いて各種癌細胞と細胞外マトリックスとの相互作用などを調べていたところ、例えば、マウスニューロblastoma C1300または大腸癌細胞株Colon 26と細胞外マトリックスとの相互作用は上述の2抗体では解析が不可能であり、他のVLA分子を介した相互作用が関与しているとの結論を得た。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】このような状況下、本発明者らはVLA-4および5以外のVLAに対するモノクローナル抗体を作製すれば、これら細胞におけるVLAを介した細胞間相互作用について解析が進むのではないかと考え、鋭意検討を重ねた。その結果、マウスのVLA-1に対して特異的に反応するモノクローナル抗体および該抗体を産生するハイブリドーマの取得に成功し、本発明を完成するに至った。即ち、本発明はマウスのVLA-1に特異的に反応するモノクローナル抗体またはその活性フラグメント、該モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ、および該モノクローナル抗体の製造方法を提供するものである。

4

【0010】

【課題を解決するための手段】本発明のマウスVLA-1に対するモノクローナル抗体および該モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、以下のようにして製造することができる。即ち、(1)VLA-1を発現していると考えられるマウスニューロblastoma細胞株(C1300)を抗原として用いて齧歯類動物を免疫感作し、(2)該免疫感作した動物の脾細胞とマウスのミエローマ細胞とを融合させてハイブリドーマを得、(3)VLA-1に対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを選択し、(4)該選択したハイブリドーマを適当な条件下で培養してモノクローナル抗体を産生させ、これを回収する。

【0011】さらに詳しくは、上記の製造方法は以下の工程からなる：

(i)齧歯類動物をマウスニューロblastoma細胞(C1300)で免疫感作し、(ii)該免疫感作した齧歯類動物から脾臓を摘出して脾細胞の懸濁液を調製し、(iii)該脾細胞の懸濁液をマウスのミエローマ細胞と融合促進剤の存在下で混合して両細胞を融合し、(iv)融合した細胞を未融合ミエローマ細胞を支持しない媒質中で希釈して培養し、(v)ハイブリドーマを含有する各培養ウエル中の上清液について、マウスニューロblastoma細胞(C1300)との反応性を指標にして抗体の存在を確認し、(vi)所望の抗体を産生するハイブリドーマを選択した後、限界希釈法により単一クローンにし、(vii)その単一クローンのハイブリドーマの培養上清液から抗体を回収する。

【0012】上記の方法を実施する際の齧歯類動物としては種々の動物を挙げることができるが、アルメニアンハムスターが好ましい。免疫感作の抗原として用いるマウスニューロblastoma細胞株(C1300)は、順天堂大学医学部免疫学教室から入手することができる。マウスのミエローマ細胞としては各種細胞を用いることができるが、マウス由来の $\alpha$ -アザグアニン耐性株であるP3U1が好ましい。脾細胞とミエローマ細胞を融合させる方法としては種々の方法を用いることができるが、融合促進剤としてポリエチレングリコールを用いる方法が簡便である。未融合ミエローマ細胞を支持しない媒質としては、例えばHAT培地を用いることができる。

【0013】所望の抗体を産生しているハイブリドーマの選択は、例えば次のようにして行うことができる。まず、ハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体がVLA-1を発現しているマウスニューロblastoma細胞株(C1300)と反応するか否かをFACSで調べる。さらに、このモノクローナル抗体がVLA-1を発現している細胞のVLA-1分子と反応することを免疫沈降の実験により特定し、最終的にVLA-1に対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを選択する。本発明のモノクローナル抗体は、上記で選択したハ

(4)

特開平8-131185

5

イブリドーマを適当な培地で培養した後、その培養上清から、または、例えばマウス腹腔にハイブリドーマを注射した後、その腹水液から回収することができる。回収した抗体を、当分野の常法に従って精製することができる。

【0014】本発明は、マウスVLA-1分子に特異的に反応するモノクローナル抗体だけでなく、その活性フラグメントをも包含するものである。モノクローナル抗体は特定の抗原物質を認識する均一な免疫グロブリンであり、その活性フラグメントとは、抗原抗体反応活性を有するモノクローナル抗体のフラグメントを意味し、具体的には、F(ab')<sub>2</sub>、Fab'、Fab、Fv、および組換えFv体などを挙げることができる。これらの活性フラグメントは、本発明のモノクローナル抗体から常法により調製することができる。

【0015】F(ab')<sub>2</sub>フラグメントは、免疫グロブリンIgGをペプシンを用いて消化することにより得られるフラグメントの1つである。IgGをpH4.0付近でペプシン消化すると、H鎖のヒンジ部で切断されて、分子量が約10万のフラグメントを生成する。この切断は、H鎖間のジスルフィド結合よりもC末端側で起こる。このフラグメントは、抗原結合部位が2個あるので、抗原に結合して、沈降反応や凝集反応を起こすことができる。

【0016】Fab'フラグメントは、F(ab')<sub>2</sub>フラグメントを2-メルカプトエタノールなどの試薬で還元して、モノヨード酢酸でアルキル化すると、H鎖間のジスルフィド結合が切断されて生じる分子量が約5万のフラグメントである。

【0017】Fabフラグメント(抗原結合性フラグメント)は、IgGをパバイン消化することにより得られるフラグメントの1つである。IgGをシステインの存在下にパバイン消化すると、ヒンジ部のH鎖間のジスルフィド結合よりN末端側の位置でH鎖を切断し、2個のFabと1個のFc(crystallizable fragment)を生成する。Fabフラグメントは、H鎖のN末端側の約半分に相当するFdフラグメント(V<sub>H</sub>ドメイン+C<sub>H</sub>1ドメイン)とL鎖とがジスルフィド結合した分子量が約45,000のフラグメントである。Fabフラグメントは、抗原結合部位を1個有している。

【0018】Fvフラグメントは、非共役結合で結合したH鎖可変部(V<sub>H</sub>)とL鎖可変部(V<sub>L</sub>)からなる抗原結合可能なフラグメントである。

【0019】組換えFv体は、モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマからDNAをシーケンスして、V<sub>H</sub>とL<sub>H</sub>をコードする各塩基配列を決定し、次いで、これらのDNA断片をベクターに組み込んで、V<sub>L</sub>-リンカー-V<sub>H</sub>の構造を有する一価の抗体活性フラグメントを産生させることにより得ることができる。IgG、FabまたはF(ab')<sub>2</sub>では、V<sub>H</sub>とL<sub>H</sub>はS-S結合により結合

6

しているが、組換えFv体フラグメントでは、V<sub>H</sub>とL<sub>H</sub>との間にリンカーを挿入して、S-S結合している状態と同様の立体構造がとれるようにしている。このフラグメントは、単にFvと呼ばれることがあり、またSCFv(single chain Fv)とも呼ばれている。組換えFv体は、大腸菌等の微生物やバクテリオファージによって発現させることもできる。

【0020】

【発明の効果】本発明のVLA-1に対するモノクローナル抗体およびその活性フラグメントは、マウスVLA-1に反応することから、以下に述べるような種々の用途が考えられる。即ち、VLA-1を発現しているリンパ球とそのリガンドであるコラーゲンまたはラミニンとの相互作用の解析を行うことにより、動物胚発生における細胞の遊走、分化、増殖、さらには、創傷治癒、癌細胞転移などにおけるVLA-1とコラーゲンまたはラミニンのメカニズムを理解することができる。また、近年慢性関節リウマチ患者の関節滑膜にもECMが存在していることがわかっていることから、これら疾患におけるECMの機能解析において本発明に係るモノクローナル抗体は有力な武器となり得る。さらに、本発明のモノクローナル抗体およびその活性フラグメントを、免疫化学的な研究だけでなく、免疫治療や診断のために用いることもできる。このような用途は当業者には明らかであろう。

【0021】

【実施例】以下に実施例を挙げ、本発明をさらに詳しく説明する。

**実施例1** モノクローナル抗体の作成および特性化

A. 免疫感作

マウスニューロblastoma細胞(C1300)(順天堂大学医学部免疫学教室より入手)をPBS(リン酸緩衝食塩水)に懸濁し、1×10<sup>7</sup>個をpolyA/polyUアジュバンド(SIGMA製)と共にアルミニウムハムスター(極東製薬、メス、8週齢)の腹腔内に注射した。次いで、2週間後から週1回で合計6回、同一ハムスターにC1300細胞を注射することにより、免疫感作した。

【0022】B. 細胞融合

最終免疫の3日後に上記ハムスターから脾臓を取り出した。取り出した脾臓を細断後、メッシュで濾過し、RPMI1640培地[(株)日研生物医学研究所製]に浮遊させ、脾細胞を1×10<sup>8</sup>個得た。この脾細胞とマウス由来のα-アザグアニン耐性株(ヒポキサンチン/グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ欠損株)P3U1(ATCC CRL1597)2×10<sup>7</sup>個を約5:1の割合で混合し、遠心した(1500rpm, 5分)。得られた細胞のペレットに、50%ポリエチレングリコール4000(メルク製)/RPMI1640溶液2mlを、37℃の温水中で攪拌しながら1分間を要して加えた。これにRPMI1640溶液15mlを攪拌しながら6分間を要し

(5)

特開平8-131185

7

て加え、細胞融合を行った。融合後、大量(約40ml)のRPMI 1640溶液を加え、遠心分離(1500rpm、5分)して上清を除去した。次いで、ヒポキサンチン(100μM)、アミノプテリン(0.4μM)、チミジン(10μM)を含む10% FCS-RPMI 1640培地(HAT培地)にて、脾細胞が $1 \times 10^6$ 個/mlになるように調製した。

#### 【0023】C. ハイブリドーマの選択

上記Bで調製した細胞浮遊液を96ウェルマイクロプレート5枚に200μl/ウェルで分注し、37℃、5% CO<sub>2</sub>下のCO<sub>2</sub>インキュベータで細胞を培養した。1週間後には、ハイブリドーマのみがコロニーを形成して、増殖していることが確認できた。

#### 【0024】D. C1300ニューロプラストーマ細胞と反応する抗体を産生するハイブリドーマの選択

上記Cで得たハイブリドーマが産生する抗体がVLA-1分子を発現しているマウスニューロプラストーマ細胞(C1300)と反応するかどうかを、Fluorescence Activated Cell Sorter(FACS)(フローサイトメトリー)によって調べた。C1300ニューロプラストーマ細胞をPBSで $1 \times 10^7$ 個/mlに調製し、フィッシャーチューブに $1 \times 10^6$ 個ずつ入れた。このチューブに上記Cのハイブリドーマ培養液の培養上清200μlを入れ、氷上で20分間反応させ、PBSで遠心洗浄した(3,000rpm、1分、3回)。次いで、FITC-抗ハムスターIg's(カルタゴ製)(100倍希釈)を100μl入れ、氷上で20分間反応させた。反応の後、PBSによる遠心洗浄を2回行い、PBS 200μlに懸濁し、FACScanで測定した。このようにして、C1300細胞と反応する抗体を産生するハイブリドーマを選択した。

#### 【0025】E. クローニング

上記Dで選択したウェルで増殖しているハイブリドーマを限界希釈法でクローニングした。希釈後の細胞濃度が1個/ウェルとなるように10% FCS-RPMI 1640培地で希釈し、96ウェルのプレートに200μlずつ分注し、37℃の5% CO<sub>2</sub>下で培養した。約1週間後にハイブリドーマの増殖が認められた。コロニーがある程度の大きさになってから、上記Dの方法で再度抗体の検出を行った。この操作を2回繰り返し、安定にC1300細胞と反応する抗体を産生するハイブリドーマを得ることができた。このハイブリドーマが産生する抗体をSDS-PAGEし、その分子量からIgG型のハムスター抗体であることを確認した。

#### 【0026】F. Adhesion assay

ラミニンをコートするため、96ウェルプレートIMMULON 2 (ダイナテック社製)に、10μg/mlのラミニン(GIBCO社製)を50μl/ウェルで分注し、37℃で2時間インキュベートした。次いで200μl/ウェルの1% BSA/PBSで37℃、2時間のインキュベートによりブロッキングを行い、PBSで3回洗浄し

8

た。細胞(C1300)を無血清培地AIM-V(GIBCO社製)で懸濁して $1 \times 10^7$ 細胞/mlとし、10μmol/LのBCECF-AM[2', 7'-ビス(2-カルボキシエチル)カルボキシフルオレセイン テトラアセトキシメチルエステル](和光純薬製)とともに37℃で30分間インキュベートすることにより細胞内を蛍光ラベルした後、PBSで3回洗浄した。蛍光ラベルしたC1300に上記Eで得たハイブリドーマの培養上清100μlを加え、37℃で30分間プレインキュベートした。ラミニンをコートしたプレートにプレインキュベートした細胞を $1 \times 10^5$ 細胞/50μl(AIM-V)/ウェルで蒔き、37℃で30分間インキュベートし、ラミニンにC1300を接着させた。接着しなかった細胞を取り除き、1% NP40/PBSを100μl/ウェルに加え、接着した細胞を溶解し、フルオロスクランII(ラボシステムズ社製)で蛍光強度を測定した。培養上清を加えないときの蛍光強度を100%として%対照とした。また、コラーゲンについても同様にしてAdhesion assayを行った。その結果、得られたハイブリドーマが産生する抗体はVLA-1とラミニンとの結合、およびVLA-1とコラーゲンとの結合を阻害することがわかった(図1)。すなわち、この抗体がVLA-1に対する抗体であることが示された。

#### 【0027】G. Immunoprecipitation

得られたハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体が、マウスニューロプラストーマ細胞(C1300)のVLA-1分子に対する抗体であることを免疫沈降によりチェックした。

#### 【0028】(1)細胞のビオチン化

マウスニューロプラストーマ細胞(C1300)を75cm<sup>2</sup>培養フラスコ中、10% FCS-RPMI 1640培地にて $2 \times 10^7$ 個培養した。1,500rpmで5分間の遠心分離によりC1300細胞を回収した後、PBSにて1回遠心洗浄した。その後、HBSS(ハanks緩衝液)で3回遠心洗浄した。上清液を吸引した後、細胞ペレットを0.1MのHepes(ヘベス; N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N'-2-エタンスルホン酸)緩衝液(pH 8.0)2mlに懸濁した。その後、10mg/mlのNHS-ビオチンを20μl入れ、40分間室温でローテーターを用いて反応させた。次いで、4℃に冷したRPMI 1640溶液にて3回遠心洗浄した。

#### 【0029】(2)細胞の溶解

上記(1)で得たビオチン化細胞のペレットに400μlの溶菌緩衝液[50mM Tris-HCl、150mM NaCl、1% トリトンX-100、50mM ヨードアセトアミド、2mM MgCl<sub>2</sub>、2mM CaCl<sub>2</sub>、0.1% アジ化ナトリウム、10μg/ml 大豆トリプシンインヒビター、1μg/ml アプロチニン、1mM PMSF(フェニルメチルスルホニルフロライド)、1μg/ml ロイペプチン]を加え、十分に攪拌した後、氷上にて30分間放置し

(6)

特開平8-131185

9

た。その後15,000rpmで10分間遠心し、上清液を回収した。これを200μlずつ2本に分けた。

#### 【0030】(3)プレクリアー(preclear)

上記(2)のように回収した上清液200μlに、正常ハムスターIgGをCNBr活性化セファロースに結合させたビーズ100μlを入れ、4℃で一晩反応させ、非特異的結合タンパク質を除去した。その後、12,000rpmで1分間の遠心によってビーズを沈降させ、上清を回収した。

#### 【0031】(4)免疫沈降

上記(3)で回収した上清の1本目には、正常ハムスターの血清を結合させたセファロースゲル100μlを入れ、他の1本には、今回樹立したハイブリドーマが産生する抗体をCNBr活性化セファロースに結合させたビーズ100μlを入れ、室温で2時間反応させた。洗浄液[50mM Tris-HCl(pH8.3)、0.6M 塩化ナトリウム、0.5% NP-40、0.1% アジ化ナトリウム]で3回遠心洗浄した後、ゲルに2% SDS(ドデシル硫酸ナトリウム)を含むサンプル緩衝液[10% グリセロール、5% 2-メルカプトエタノール、2.3% SDS、0.625M Tris-HCl(pH6.8)、1mg/100μl BPP(プロモ・フェノール・ブルー)]を20μl入れ、5分間煮沸した。その後、4~20%のSDS-PAGEゲル(第一化学製)を用いて非還元条件(NR)および還元条件(R)で電気泳動した。電気泳動の後、トランスブロットシステム(バイオラッド製)を用いてニトロセルロース膜(Sartorius製)に転写した。

#### 【0032】(5)発色反応

上記(4)で得たニトロセルロース膜を1% BSA(牛血清アルブミン)-PBSに浸し、1時間放置し、ブロッキングした。その後、ABC溶液(アビジン-ビオチン化ペルオキシダーゼ混合液)(ベクター製)に浸し、30分間反応させた。0.05% ツィーン20/PBSにて3

10

回洗浄した(10分間インキュベート×3)。アマーシャムのECLウエスタンブロッティング検出システムの発色キットを用いて反応させた後、X線フィルムで露光し、ハイブリドーマが産生する抗体と反応するタンパク質を検出した(図2)。図2において、非還元および還元とも、レーン1は正常ハムスター血清で、レーン2は今回樹立した抗体で免疫沈降させた結果を示す。

【0033】また、今回樹立した抗体で沈降させたタンパク質を、さらにラビットα1抗血清、β1抗血清等で沈降させて検出した結果(図3)からも、今回樹立したハイブリドーマが産生する抗体はVLA-1のαβヘテロダイマーを免疫沈降することができ、この抗体がVLA-1に対する抗体であることを確認した。図3において、レーン1は正常ハムスター血清、レーン2は今回樹立した抗体、レーン3は正常ラビット血清、レーン4は抗α1ラビット血清、レーン5は抗β1ラビット血清を用いて免疫沈降させた結果を示す。

【0034】VLA-1に対するモノクローナル抗体を産生する株であるハイブリドーマHMα1は、工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号:FERM P-14546で寄託されている(受託日:1994年9月21日)。

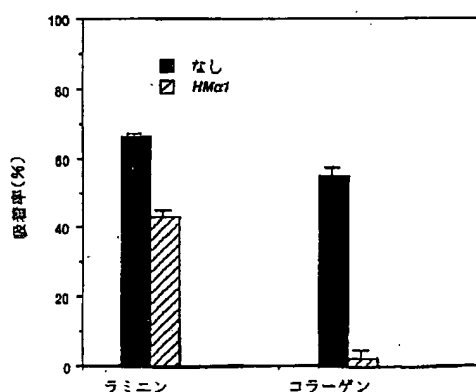
#### 【図面の簡単な説明】

【図1】 本発明のハイブリドーマが産生する抗体によるVLA1とラミニンおよびコラーゲンとの結合の阻害を調べた結果を示すグラフである。

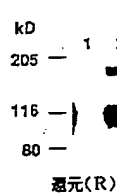
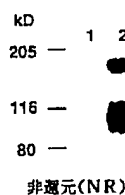
【図2】 本発明のハイブリドーマが産生する抗体と反応するタンパク質をウエスタンブロットにより検出した結果を示す模式図である。

【図3】 本発明のハイブリドーマが産生する抗体で沈降させたタンパク質を、さらにラビット血清を用いてウエスタンブロットにより検出した結果を示す模式図である。

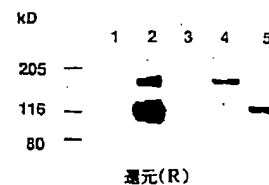
【図1】



【図2】



【図3】



(7)

特開平8-131185

フロントページの続き

(51) Int. Cl. 6	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/02				
G 0 1 N 33/53		V		
		B		
// A 6 1 K 39/395		N		
(C 1 2 P 21/08				
C 1 2 R 1:91)				

(72)発明者 奥村 康  
東京都文京区本郷2-1-1 順天堂大学  
医学部内

(72)発明者 宮部 由紀  
大阪府大阪市此花区島屋一丁目1番3号  
住友電気工業株式会社大阪製作所内